

Dr hab. n. med. Elżbieta Salińska
Zakład Neurochemii
IMDiK PAN
02-106 Warszawa, Pawińskiego 5

Warszawa, 18 października 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Agnieszki Wnuk

Pt. „Efekty działania chemicznego filtra UV, benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy”

Rozwój cywilizacji oraz wzrost zapotrzebowania na różne przedmioty wprowadzane przez różne branże przemysłu, a mające ułatwić życie człowieka, pociągają za sobą rozwój konkretnych gałęzi przemysłowych. Jedną z największych jest branża chemiczna, dostarczająca coraz to nowych składników stosowanych w produkcji tworzyw sztucznych, barwników czy kosmetyków. Część z tych nowych związków chemicznych jest nieszkodliwa dla ludzi i środowiska, jednak większość z nich okazuje się mieć niekorzystny wpływ na szeroko pojętą przyrodę oraz na organizm człowieka. Często to negatywne działanie wychodzi na jaw po dłuższym czasie, kiedy dany związek chemiczny znalazł już zastosowanie w produkcji wielu przedmiotów codziennego użytku.

Taka sytuacja ma miejsce w odniesieniu do benzofenonu-3, inaczej zwanego oksybenzonem, substancji o właściwościach filtra UV. Ze względu na swoje właściwości, chroniące przed działaniem promieni słonecznych, znalazł on zastosowanie w produkcji plastiku, tekstyliów, żywic, farb i lakierów, a przede wszystkim w kosmetyce jako składnik balsamów przeciwsłonecznych, kremów, szamponów i lakierów do włosów czy paznokci. Produkcja benzofenonu-3 sięgnęła setek ton rocznie, zanim odkryto negatywne efekty kontaktu z tym związkiem. Benzofenon-3 może wnikać bezpośrednio przez skórę i akumulować się w organizmie oddziałując na niego niekorzystnie. Niepokojące są doniesienia o możliwym negatywnym działaniu benzofenonu-3 wynikającym z prenatalnej i/lub postnatalnej ekspozycji dzieci i jego udziału w chorobach rozwojowych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska włącza się w nurt badań nad toksycznym działaniem benzofenonu-3, w tym przypadku nad toksycznym działaniem na komórki nerwowe. Powiązanie znanej estrogennej aktywności benzofenonu-3 z potencjalnym zaburzeniem procesów rozwojowej apoptozy, autofagii oraz mechanizmów epigenetycznych zachodzących w komórkach nerwowych zaowocowało ciekawymi wynikami stanowiącymi treść przedstawionej pracy. Przedstawione przez doktorantkę badania molekularnych oddziaływań benzofenonu-3 na wspomniane procesy poszerzają w dużym stopniu wiedzę na temat neurotoksycznego działania tego związku.

Przedstawione do oceny rozprawa doktorska skonstruowana jest w formie spinki opublikowanych prac z dołączoną częścią opisową, składającą się z obszernego wstępu, po którym autorka umieściła skondensowany opis hipotezy roboczej i cele pracy. Główne metody zastosowane w pracach przedstawione zostały w formie klarownego schematu graficznego, a dodatkowe informacje o stosowanych metodach znalazły się w części w której omówiono wyniki doświadczeń z poszczególnych prac.

Doktorantka jest autorką kilkunastu prac opublikowanych w międzynarodowych czasopismach, a do spinki wybrała trzy tematycznie spójne prace, w których jest pierwszym autorem. Prace te opublikowane zostały w wysoko impaktowanych czasopismach, a oświadczenia współautorów tych prac oraz samej doktorantki wskazują na wiodący wkład Doktorantki w ich powstanie. Wiążącym te trzy prace tematem jest benzofenon-3 oraz jego oddziaływanie na komórki nerwowe.

Wstęp wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, pozwalając zapoznać się z charakterystyką chemiczną badanego związku oraz ze znanymi już negatywnymi ubocznymi efektami powszechnego stosowania go jako filtra UV. Jak się wydaje, jednym z największych niebezpieczeństw dla organizmu ludzkiego jest stosowanie balsamów i kremów zawierających benzofenon-3, który dość łatwo przenika do tkanek wewnętrznych. Łatwość z jaką benzofenon-3 przedostaje się do łożyska, płynu owodniowego, krwi pępowinowej i płodowej oraz mleka matek, może wskazywać na jego udział w nieprawidłowym rozwoju neuronów w fazie embrionalnej oraz postnatalnej.

W dalszej części wstępu znajdujemy informacje dotyczące procesów komórkowych na które może mieć wpływ benzofenon-3, takich jak apoptoza, autofagia czy mechanizmy epigenetyczne. Znajdujemy również opis receptorów, które wykazują wrażliwość na obecność

benzofenonu-3, takie jak receptory estrogenowe, retinoidowe typu X (RXR) czy receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów typu gamma (PPAR γ).

Ta część pracy doktorskiej generalnie mi się podoba i jest świadectwem bardzo dobrej orientacji doktorantki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Moje zastrzeżenia budzi jedynie stwierdzenie, że wyniki zamieszczone w pracy Schlecht i wsp. z 2004 roku były jedynym doniesieniem na temat działania benzofenonu-3 w układzie nerwowym. Są dwie przyczyny moich zastrzeżeń - po pierwsze we wspomnianej pracy pokazano efekty działania benzofenonu-3 w macicy i przysadce mózgowej. Przysadka mózgowa jest gruczołem wydzielniczym i mimo, iż jej płat tylny zbudowany jest z komórek glejowych i włókien nerwowych, nie stanowi ona elementu układu nerwowego. Po drugie, Fediuk DJ i wsp. w pracy z 2010 roku pokazali neurotoksyczne działanie benzofenonu-3 na hodowlach neuronalnych, jednak efekt ten obserwowali dopiero po 7 dniowej ekspozycji na ten związek. Szkoda, że doktorantka nie włączyła tej pracy do dyskusji wyników.

W dalszej części tekstu Doktorantka formułuje jasną hipotezę badawczą oraz konkretne cele badawcze, mające tą hipotezę zweryfikować. Hipoteza zakłada, że neurotoksyczny i pro-apoptotyczny efekt działania benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy związany jest z jego oddziaływaniem na receptory estrogenowe, retinoidowe typu X a także receptorem PPAR γ . Ponadto hipoteza zakłada, że zaburza on procesy autofagii w komórkach nerwowych oraz zmienia profil epigenetyczny tych komórek. Doktorantka stawia sobie za cel zbadanie tych efektów w hodowlach pierwotnych komórek nerwowych myszy wystawionych na działanie benzofenonu-3 oraz hodowlach neuronów uzyskanych z myszy wystawionych na prenatalne działanie tego związku. W prowadzonych badaniach doktorantka korzystała z szerokiego wachlarza metod, od oznaczeń biochemicznych, poprzez cytochemię i immunochemię po nowoczesne metody oznaczania ekspresji mRNA. Wiedza i bogaty warsztat badawczy doktorantki świadczą o dużej praktyce w planowaniu i prowadzeniu badań oraz wskazuje na gotowość do poprowadzenia samodzielnej ścieżki naukowej.

Metody stosowane w badaniach zawartych w pracy doktorskiej mgr Agnieszki Wnuk są dobrze dobrane i owocują ciekawymi wynikami. Zastanawia mnie jednak, dlaczego w tej części badań, w których benzofenon-3 podawano ciężarnym samicom, oznaczenia prowadzono na hodowlach neuronów zakładanych z embrionów narażonych na prenatalną ekspozycję na benzofenon-3, a nie na materiale tkankowym, który można było uzyskać z tych embrionów, a jeszcze lepiej z kilkudniowych oseków. Komórki nerwowe w warunkach

hodowlanych nie zawsze w pełni reprezentują zmiany zachodzące w neuronach po ekspozycji dawcy na toksyczny związek. Ta uwaga nie ma na celu poddania w wątpliwość uzyskanych wyników, a jest jedynie sugestią na przyszłość.

Wyniki zawarte w publikacjach wybranych do przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wnuk w logiczny i interesujący sposób prowadzą nas przez kolejne etapy pracy zmierzającej do realizacji postawionych celów badawczych i potwierdzenia założeń hipotezy badawczej. W pierwszej pracy z cyklu tworzącego pracę doktorską, doktorantka wykazała, że już 25 μM stężenie benzofenonu-3, odpowiadające stężeniu zakumulowanego związku w tkance tłuszczowej człowieka, wykazało neurotoksyczne i pro-apoptotyczne działanie na hodowane neurony. Działanie to zgrabnie powiązano z hamowaniem przez benzofenon-3 funkcji receptorów ESR1 i PPAR γ oraz stymulacją ESR2 i GPER1. Zmianom tym towarzyszyła zmiana ekspresji receptorów. W drugiej pracy wykazano, iż wywołana działaniem benzofenonu-3 apoptoza jest związana ze stymulacją sygnalizacji związanej z receptorem RXR α przy jednoczesnym osłabieniu ścieżek związanych z RXR β /RXR γ . Wykazano też, że benzofenon-3 upośledza autofagię i zmienia status epigenetyczny badanych komórek nerwowych. W ostatniej pracy cyklu pokazano, że prenatalna ekspozycja na benzofenon-3 upośledza ekspresję kanonicznych receptorów ESR1/ESR2 oraz zwiększa ekspresję receptora związanego z białkiem G - GPER1, czemu towarzyszy nasilenie procesów apoptotycznych w hodowanych neuronach. Wyniki te wskazują, że prenatalna ekspozycja na benzofenon-3 może wiązać się z powstawaniem nieprawidłowości i zaburzeń na wczesnym etapie rozwoju układu nerwowego, które mogą ujawnić się dopiero w dorosłym życiu. Szkoda, że nie przeprowadzono żadnych badań behawioralnych na dojrzałych szczurach poddanych prenatalnej ekspozycji na benzofenon-3; mogło by to dostarczyć dodatkowych informacji na temat toksycznego działania benzofenonu-3.

Uwaga na marginesie – przeglądając pierwszą w cyklu publikację zauważyłam, że prążek pokazujący ekspresję białka PPAR γ po ekspozycji neuronów na benzofenon-3 przedstawiony na Ryc. 8c, jest znacznie mocniejszy niż w kontroli. Podejrzewam, że jest to zwykły błąd edytorski, gdyż tabelka (Ryc. 8d) oraz tekst pracy informuje nas, że ekspresja tego białka zmalała pod wpływem działania benzofenonu-3.

Obszerna dyskusja analizująca wyniki badań nad działaniem benzofenonu-3 na hodowle pierwotne neuronów oraz zmian zachodzących w neuronach embrionów poddanych prenatalnej ekspozycji, wskazuje kolejny raz na dobrą znajomość tematu oraz umiejętność

doktorantki dyskusowania otrzymanych wyników z wynikami innych badaczy pracujących nad tym samym problemem. Klarowne podsumowanie i logiczne wnioski potwierdzają umiejętność doktorantki wnikliwej analizy własnych wyników.

We wniosku końcowym mgr. Agnieszka Wnuk wyraźnie podkreśla nowe elementy, jakie przedstawione badania wniosły do ogólnej wiedzy, dodając czytelne, graficzne podsumowanie wyników.

Doktorantka wskazuje, że zawarte w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej badania po raz pierwszy wykazały bezpośredni związek ekspozycji na benzofenon-3 z indukcją apoptozy, zahamowaniem autofagii oraz zmianą wzoru epigenetycznego komórek nerwowych uzyskanych z embrionów myszy. Zmiany ekspresji i zaburzenia funkcji receptorów estrogenowych, retinoidowych typu X oraz receptora PPAR γ obserwowane po ekspozycji na benzofenon-3 wydają się być ważnym elementem powyższych procesów.

Dla mnie szczególnie ważne jest ukazanie w tej pracy neurotoksycznego działania benzofenonu-3 w dawce, jaka może się akumulować po stosowaniu zawierających go kosmetyków zarówno przez osoby dorosłe, dzieci jak i kobiety w ciąży. Zgadzam się ze stwierdzeniem Doktorantki, że wykonane przez nią badania mogą pomóc w opracowaniu zasad profilaktyki, względnie strategii terapeutycznych w przypadku narażenia na większe dawki benzofenonu-3.

Całość rozprawy doktorskiej wskazuje na dojrzałość mgr Agnieszki Wnuk jako naukowca i pozwala wnioskować, że jej przyszła kariera jako samodzielnego badacza będzie godna uwagi. Wszelkie uwagi zawarte w tej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Wyniki badań w niej zawarte są niewątpliwie ważnym przyczynkiem do badań prowadzonych nad mechanizmami toksycznego działania benzofenonu-3.

Reasumując, przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Agnieszki Wnuk w pełni spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zawarte w stosownych ustawach. Dlatego też, z pełnym przekonaniem przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii PAN wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Wnuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Elżbieta Salińska